

Trabajo de final de grado

Proteínas antifúngicas de *Penicillium
expansum*: producción, evaluación
frente a podredumbres de manzana y
potencial efecto sinérgico

Ana Monge Escartín

Doble grado de biotecnología y bioquímica y biología molecular

Tutor académico: María Montserrat Poblet Icart

Tutores de la entidad colaboradora: Paloma María Manzanares Mir y José Francisco
Marcos López

Tarragona, septiembre de 2019

Universitat Rovira i Virgili

ÍNDICE

RESUMEN	2
DATOS DEL CENTRO	3
INTRODUCCIÓN	4
Las infecciones fúngicas y la necesidad del desarrollo de nuevos antifúngicos	4
Proteínas antifúngicas como alternativa a los fungicidas	5
<i>Penicillium expansum</i>	6
AFP de <i>Penicillium expansum</i>	7
Efecto de las AFPs en ensayos de protección <i>in vivo</i>	9
Producción de las AFPs.....	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Cepas, medios y condiciones de cultivo	12
Purificación de la proteína PeAfpA	12
Producción de AFPs en tejido de manzana infectado por <i>P. expansum</i>	13
Western blot	14
Ensayo de actividad antifúngica <i>in vivo</i> : infección en manzanas.....	15
Ensayo de actividad antifúngica <i>in vitro</i>	15
RESULTADOS	17
Producción de las AFPs de <i>P. expansum</i>	17
Purificación de PeAfpA.....	23
Ensayos de infección sobre manzanas	26
Ensayos de sinergia de AFPs <i>in vitro</i>	27
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	35
AGRADECIMIENTOS	36
BIBLIOGRAFÍA	37
AUTOEVALUACIÓN	39

RESUMEN

La escasez de fungicidas y la aparición de resistencias a los mismos hacen necesaria la búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas con nuevos modos de acción. Las proteínas antifúngicas (AFPs) producidas por hongos filamentosos son proteínas pequeñas, altamente estables, catiónicas y ricas en cisteínas, y que tienen un gran interés biotecnológico porque muestran una elevada capacidad antifúngica. *Penicillium expansum* es un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad del moho azul en diversos frutos y vegetales y codifica en su genoma tres AFPs llamadas PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. PeAfpA es la única que ha sido detectada hasta la fecha en los sobrenadantes de cultivo de *P. expansum* y ha demostrado una actividad relevante frente a diferentes fitopatógenos incluido el propio hongo.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las tres AFPs de *P. expansum* se han llevado a cabo nuevos ensayos sobre su producción y actividad antifúngica. Además de producir PeAfpA, se ha detectado por primera vez la proteína PeAfpC en medio YPD independientemente de su fuente de carbono, siendo además la primera vez que se describe la producción simultánea de dos AFPs de distinta clase filogenética por la misma cepa. En cambio, no se ha detectado ninguna de las tres AFPs durante infección de *P. expansum* en manzana. En cuanto a la capacidad antifúngica, PeAfpA no ha demostrado tener un efecto protector determinante frente a la infección de *P. expansum* en ensayos sobre manzana, poniendo de manifiesto la falta de correlación con los ensayos antimicrobianos *in vitro*. Por último, PeAfpA ha demostrado tener un efecto antifúngico sinérgico cuando se combina con PeAfpB y con PdAfpB de *P. digitatum* en ensayos *in vitro*, lo que sugiere las combinaciones de AFPs como una posible estrategia futura para aumentar su actividad y posibilitar su aplicación.

Palabras clave: Proteínas antifúngicas, hongos fitopatógenos, *Penicillium expansum*, producción, manzana, sinergia.

DATOS DEL CENTRO

Este trabajo de fin de grado se ha basado en unas prácticas extracurriculares realizadas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), un centro de investigación que fue creado en 1966 en Paterna (Valencia). El IATA forma parte del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), la principal institución pública para la investigación científica y el desarrollo tecnológico en España.

El objetivo del IATA es llevar a cabo investigación de excelencia sobre la producción de alimentos de calidad de forma sostenible, su seguridad, impacto sobre la salud y aceptación por el consumidor. El IATA participa en proyectos de I+D+i que cuentan con financiación tanto a nivel nacional como europeo e internacional. Asimismo, el IATA trabaja estrechamente con la Industria Alimentaria en el diseño y el desarrollo de nuevos productos, procesos y servicios, y en la mejora de los existentes y participa en la formación de estudiantes de grado y posgrado.

Las investigaciones del IATA se agrupan en cuatro grandes líneas de investigación: innovación en alimentos y procesos; seguridad y conservación de alimentos; dieta, microbiota y salud y biotecnología de alimentos. Las prácticas se desarrollaron en el departamento de biotecnología de alimentos, que se dedica a la investigación orientada a comprender las bases fisiológicas y moleculares de la acción de organismos y moléculas en la producción de alimentos con el objetivo del desarrollo de nuevos procesos que mejoren la calidad, seguridad y vida media de los alimentos. En concreto, las prácticas se desarrollaron en el grupo de investigación Proteínas y Péptidos Bioactivos de Interés en Agroalimentación a cargo de los doctores Paloma María Manzanares Mir y José Francisco Marcos López, que se centra en la identificación, caracterización y desarrollo de péptidos antimicrobianos y antifúngicos de aplicación en el ámbito agroalimentario, fundamentalmente con actividad frente a hongos filamentosos.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas y la necesidad del desarrollo de nuevos antifúngicos

Las infecciones causadas por hongos patógenos ponen en riesgo la salud humana, el medio ambiente y la producción y seguridad de alimentos. El impacto de las infecciones fúngicas en humanos varía desde las infecciones superficiales, que afectan a un 25% de la población mundial, hasta las infecciones invasivas, que presentan índices de mortalidad superiores al 50% y provocan un número de muertes superior a las causadas por la malaria o la tuberculosis. El sistema inmune de los individuos sanos tiene mecanismos efectivos para prevenir las infecciones fúngicas; no obstante, el incremento en las últimas décadas de pacientes inmunodeprimidos, debido a infecciones (VIH/SIDA), a modernas terapias inmunosupresoras y a intervenciones médicas invasivas ha intensificado la necesidad de nuevos antifúngicos y el interés en la investigación de las infecciones fúngicas (Brown et al., 2012).

En el campo de la agricultura, los hongos son los principales patógenos de los vegetales en cultivo, y en el caso de frutos ya cosechados provocan pérdidas de hasta un 30% de los mismos, y por tanto tienen un enorme impacto económico. Por ello, minimizar las pérdidas postcosecha es una manera muy efectiva de aumentar la disponibilidad de alimento y reducir el área necesaria para su producción. Además, los hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, típicos causantes de enfermedades fúngicas, producen micotoxinas, sustancias que en caso de ser ingeridas pueden provocar graves consecuencias para la salud en animales y humanos (Errampalli, 2014).

Por todo lo anterior, el mercado global de antifúngicos está en continuo crecimiento. Los antifúngicos utilizados actúan principalmente sobre la biosíntesis de ergosterol, la síntesis de la pared celular y mediante la disrupción de la membrana plasmática. Estos antifúngicos tienen varios inconvenientes en términos de toxicidad, espectro de actividad, seguridad y propiedades farmacocinéticas y, además, en los últimos años se ha incrementado la aparición de cepas resistentes, de forma análoga a lo que ocurre con los antibióticos

antibacterianos, por lo que existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes antifúngicos. No obstante, a diferencia de otros patógenos, los hongos son eucariotas y evolutivamente cercanos a los seres humanos, por lo que posibles nuevas dianas de actuación se encuentran también en humanos, impidiendo su uso y, de hecho, se han desarrollado muy pocos compuestos con modos de actuación novedosos en los últimos años (Campoy y Adrio, 2017).

Proteínas antifúngicas como alternativa a los fungicidas

Las proteínas antimicrobianas (*AntiMicrobial Proteins*, AMP) son proteínas producidas por organismos procariontes y eucariotas inferiores y superiores. En organismos multicelulares, las AMPs constituyen un mecanismo primitivo de inmunidad innata para proteger a sus huéspedes del ataque de microorganismos y, en organismos inferiores, las AMPs suponen una ventaja para competir con organismos con requerimientos ecológicos y nutricionales similares. Además de su función antimicrobiana, otras funciones muy diversas se han atribuido a distintas AMPs, tales como la señalización o el control en el desarrollo y proliferación celular. A pesar de la enorme diversidad en función, estructura, espectro antimicrobiano y mecanismo de acción de las AMPs, la mayoría suelen ser pequeñas (5-8 kDa) y de carácter catiónico. Las AMPs han sido propuestas como candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevos compuestos y terapias antimicrobianas (Hegedüs et al., 2013).

Un tipo de AMP son las llamadas proteínas antifúngicas (AFPs) de origen fúngico, que son producidas y secretadas en grandes cantidades por hongos filamentosos ascomicetos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, y exhiben actividad antifúngica a concentraciones en el rango micromolar (Hegedüs et al., 2013). Las AFP son proteínas pequeñas (~50 aminoácidos), ricas en cisteínas (*Cysteine-Rich Proteins*, CRP), con una estructura en láminas β estabilizada por puentes disulfuro, que les confiere una alta estabilidad, y están filogenética y estructuralmente relacionadas con las proteínas del tipo defensinas, producidas por plantas y animales de escala filogenética muy distinta. El modo de acción de las AFPs todavía no está claro y varía en función de la proteína, pero está

relacionado con la internalización de la AFP o la interacción de esta con la pared celular o la membrana plasmática del hongo diana, provocando cambios en las cascadas de señalización, en el transporte de iones y/o en el potencial de membrana, induciendo la pérdida de integridad de dichas envolturas, la generación de especies reactivas de oxígeno y, consecuentemente, la muerte celular (Garrigues et al., 2016).

El grupo en el que se ha realizado este trabajo ha propuesto una clasificación de las AFPs en tres clases: A, B y C, basándose en un análisis filogenético de las AFPs y de las secuencias tipo AFP disponibles y en otros criterios estructurales (Garrigues et al., 2016). Las AFPs mejor caracterizadas pertenecen a la clase A, incluidas las proteínas PAF de *Penicillium chrysogenum* y la AFP de *Aspergillus giganteus*. Los hongos tienen en su genoma un número variable de genes *afp*, entre uno y tres. El hongo filamentoso *Penicillium digitatum*, patógeno común de frutos cítricos, contiene únicamente un gen *afp* correspondiente a la clase B, que codifica para la PdAfpB, proteína que ha sido caracterizada por el grupo (Garrigues et al., 2018). PdAfpB es una proteína con un elevado interés biotecnológico por su capacidad antifúngica potente frente a hongos fitopatógenos en ensayos *in vitro*, incluido su mismo hongo productor, *P. digitatum*. Por su parte, el hongo patógeno *Penicillium expansum* contiene en su genoma tres genes *afp*, correspondientes a las tres clases, A, B y C (Garrigues et al., 2017).

Penicillium expansum

Penicillium expansum es un hongo filamentoso patógeno que causa la enfermedad del moho azul en diversos frutos y vegetales, siendo uno de los patógenos más importantes a escala mundial en el fruto de la manzana. *P. expansum* es un microorganismo con distribución mundial y que generalmente se puede encontrar en la materia orgánica en descomposición y en el suelo de los huertos. Aunque puede acumularse en forma de esporas en las superficies de las frutas e infectarlas durante la etapa de cultivo, la mayoría de las infecciones ocurren durante la etapa de postcosecha y almacenaje a través de aire o de agua. A diferencia de otros hongos patógenos, *P. expansum* es incapaz de penetrar la epidermis intacta de frutas y vegetales, por lo que requiere la presencia de áreas dañadas

para penetrar e infectar al huésped. Los primeros síntomas de la enfermedad implican lesiones suaves con un ligero pardeamiento y maceración, y con el tiempo las lesiones se cubren de los conidios de color azul verdoso producidos por *P. expansum*, motivo por el que la enfermedad recibe el nombre de moho azul (Figura 1). Además, *P. expansum* produce micotoxinas, como la patulina y la ocratoxina A, que contaminan las frutas infectadas y representan un serio riesgo para la salud (Errampalli, 2014).

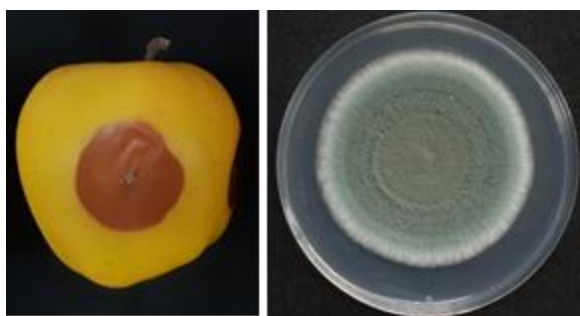


Figura 1. El hongo *Penicillium expansum* patógeno postcosecha de manzana. (A) Fruto de manzana infectado por *P. expansum*. (B) Crecimiento del hongo en placa de cultivo Patata-Dextrosa-Agar (PDA).

Los fungicidas químicos son el método principal para controlar las infecciones de moho azul causadas por *P. expansum* en frutas, principalmente los fungicidas de la clase de los benzimidazoles, como el tiabendazol. Sin embargo, su excesivo uso ha provocado la aparición de cepas resistentes (Errampalli, 2014).

AFPs de Penicillium expansum

P. expansum contiene en su genoma tres genes que codifican para tres AFPs de las tres clases A, B y C: PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC, cuya estructura terciaria se ha predicho por modelado de homología usando otras proteínas AFPs (Figura 2A). Las tres proteínas fueron satisfactoriamente producidas y purificadas (Figura 2B) (Garrigues et al., 2018). La PeAfpA se produce por el mismo hongo en condiciones de cultivo en medio mínimo mientras que, hasta el momento de este trabajo, no se había conseguido encontrar las condiciones para la producción de PeAfpB y PeAfpC por *P. expansum* y estas fueron obtenidas biotecnológicamente mediante transformación genética de los genes correspondientes a

P. chrysogenum y posterior cultivo en medio mínimo (Garrigues et al., 2018). Su capacidad antifúngica fue probada en ensayos *in vitro* frente a varios hongos patógenos, incluido el mismo hongo productor, *P. expansum* (Figura 2C). La PeAfpA mostró un elevado efecto antifúngico frente a todos los hongos incluidos en el ensayo, siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) obtenida generalmente inferior a los valores MIC obtenidos en los ensayos con la prometedora PdAfpB. La PeAfpB demostró tener un efecto antifúngico moderado frente a algunos de los hongos probados, incluido *P. expansum*, mientras que la PeAfpC no mostró ningún efecto frente a ninguno de los hongos evaluados (Tabla 1) (Garrigues et al., 2018).

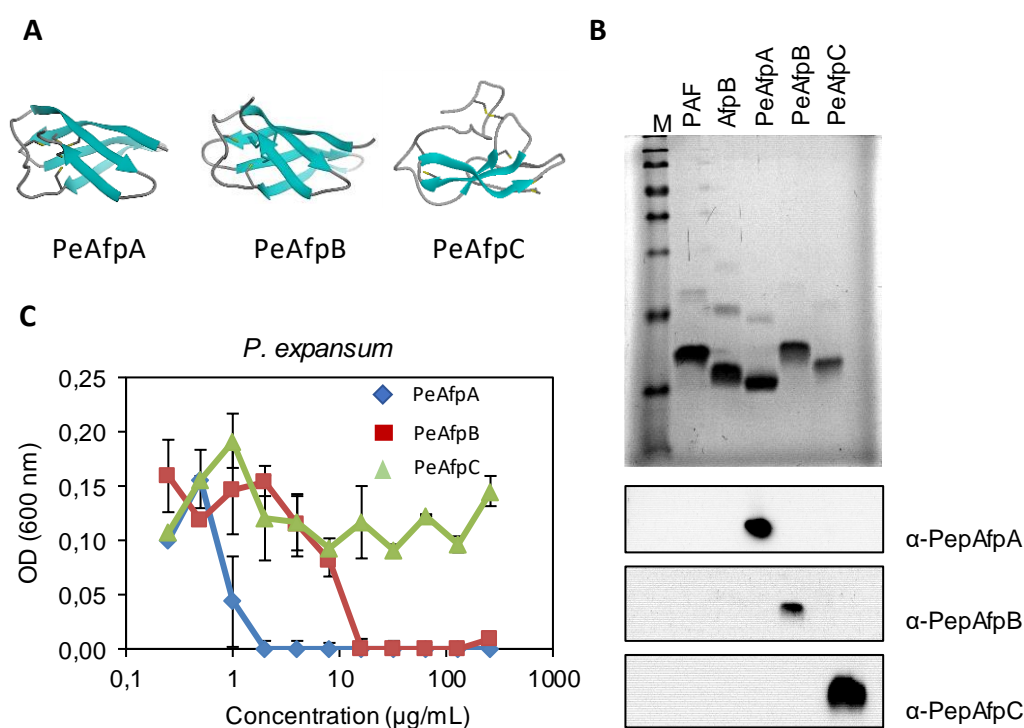


Figura 2. Proteínas antifúngicas (AFPs) de *P. expansum*. (A) Modelo tridimensional de las tres AFPs. (B) Análisis por SDS-PAGE y Western blot de PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. A modo control se incluyen PAF de *P. chrysogenum* y PdAfpB de *P. digitatum*. (C) Actividad antifúngica de las tres AFPs frente a su hongo productor *P. expansum*. (Garrigues et al., 2018).

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de las PeAFPs y de la PdAfpB frente a varios hongos filamentosos.

Hongo	PeAfpA	PeAfpB	PeAfpC	PdAfpB
<i>P. digitatum</i>	1	12	>200	3,2
<i>B.cinerea</i>	4	50	>200	12,5
<i>P. expansum</i>	2	12	>200	3,2
<i>P. italicum</i>	2	12	>200	1,6
<i>P. chrysogenum</i>	2	50	>200	6,2
<i>M. oryzae</i>	16	>200	>200	>200
<i>A. niger</i>	2	50	>200	3,2
<i>F. oxysporum</i>	4	>200	>200	100

Efecto de las AFPs en ensayos de protección *in vivo*

Los buenos resultados de las AFPs en los ensayos *in vitro* frente a las principales especies de hongos fitopatógenos llevaron a ensayar la aplicación de estas proteínas en ensayos *in vivo* de protección de frutos. Este es el caso de las proteínas PeAfpA y PdAfpB, cuyo efecto de protección de frutos de naranja frente a la podredumbre verde causada por el hongo *P. digitatum* ha sido demostrado recientemente. PeAfpA mostró tener un efecto de protección estadísticamente significativo frente a *P. digitatum* a todas las concentraciones probadas después de 6 y 7 días post-infección (dpi). Por su parte, PdAfpB no mostró protección frente a *P. digitatum* en ninguna de las condiciones probadas, aunque sí se observó una disminución en la incidencia de la infección que no llegó a ser estadísticamente significativa, tal y como se observa en la Figura 3. Además, ambas proteínas también han resultado ser eficaces inhibiendo el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* sobre frutos y plantas de tomate (Garrigues et al., 2018).

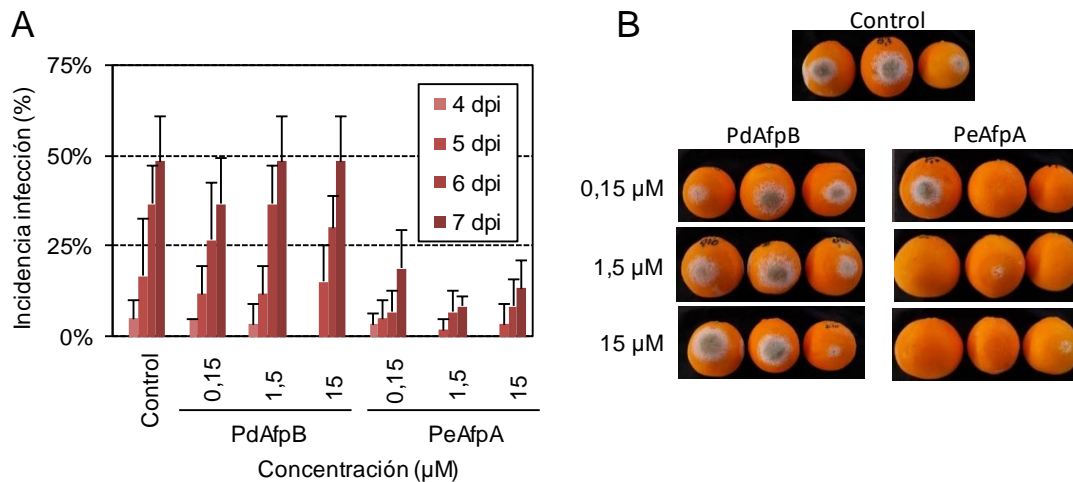


Figura 3. Efecto protector de las AFPs sobre la infección causada por *P. digitatum* en frutos de naranja. (A) Incidencia de la infección causada por *P. digitatum* (10^4 conidios/mL) a lo largo del experimento en ausencia (control) o presencia de PdAfpB y PeAfpA (0,15, 1,5 y 15 µM). (B) Imágenes representativas de las naranjas tratadas con PdAfpB y PeAfpA a 7dpi (Garrigues et al., 2018).

Producción de las AFPs

El desarrollo de las AFPs para su futura aplicación en la conservación postcosecha requiere su producción en grandes cantidades de manera rentable. Además, el conocimiento del patrón de producción de estas proteínas puede ayudar a entender la función biológica de estas proteínas.

Hay muchos ejemplos de AFPs que son producidas y secretadas al medio de manera natural por sus hongos productores con un elevado rendimiento, como la proteína de clase B de *P. chrysogenum*, PgAFP, que pudo ser purificada del sobrenadante de cultivo de *P. chrysogenum* en medio MEB con un rendimiento de 617 mg/L (Delgado et al., 2015); mientras que otras proteínas como NFAP2 de *Neosartoria fischeri* es secretada al medio en cantidades muy bajas (0,368 mg/L) (Toth et al., 2016). No obstante, existen algunas AFPs que no se han logrado obtener a partir de los sobrenadantes de cultivos de su hongo productor, como la PdAfpB de *P. digitatum* y la PAFB de *P. chrysogenum* (ortóloga de la

PgAFP), incluso aunque sí fueron detectados los transcritos de ARNm de los genes *PdAfpB* y *PAFB* respectivamente (Garrigues et al., 2016; Huber et al., 2018). En cuanto a las AFPs de *P. expansum*, únicamente la PeAfpA ha sido detectada en el sobrenadante de cultivo de *P. expansum* crecido en medio mínimo con sacarosa como fuente de carbono (PcMM), obteniendo más de 125 mg/L. Las otras dos proteínas PeAfpB y PeAfpC no fueron detectadas en el sobrenadante y fueron producidas utilizando un sistema de expresión heterólogo en *P. chrysogenum*, del mismo modo que la PdAfpB y la PAFB (Garrigues et al., 2016; Garrigues et al., 2018; Huber et al., 2018).

HIPÓTESIS

Se hipotetiza que las proteínas AFPs de *P. expansum* pueden ser producidas y secretadas en distintos medios de cultivo microbiológicos y durante la infección en manzana; y que la proteína PeAfpA tiene un efecto antifúngico potente frente a *P. expansum* en manzanas y en ensayos *in vitro* de manera sinérgica con otras proteínas AFPs.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es profundizar más en el estudio de las AFPs de *P. expansum* (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC) recientemente descubiertas, tanto en su producción como en su capacidad antifúngica frente a su propio hongo, *P. expansum*. Para ello se plantean los siguientes objetivos individuales:

- Estudio de la producción de las tres AFPs de *P. expansum* en distintos medios de cultivo microbiológico y durante la infección en su huésped natural, el fruto de manzana.
- Purificación bioquímica de la AFP de *P. expansum* más efectiva, la PeAfpA.
- Evaluación de la PeAfpA en la protección frente a la infección por *P. expansum* en manzanas.
- Evaluación de la actividad antifúngica sinérgica de la PeAfpA con las otras AFPs de *P. expansum* y con la PdAfpB en ensayos *in vitro* frente a su hongo productor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, medios y condiciones de cultivo

Para los ensayos de producción y purificación de AFPs y para los ensayos de actividad antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* se ha utilizado la cepa *P. expansum* CECT 20906 (CMP-1).

Para los estudios de producción de las tres proteínas AFP en medio líquido se han utilizado como base los medios comerciales YPD, *Yeast extract*, *Peptone and Dextrose*; 1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa o MEB *Malt Extract Broth*; 2% extracto de malta, 1% peptona, ambos con glucosa o sacarosa como fuente de carbono. El medio comercial YPD, que incluye dextrosa (D-glucosa) se ha utilizado tal cual y se ha nombrado YPD-Glc, el nuevo medio YPD-Sac tiene una composición de 1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% sacarosa; y los medios MEB-Glc y MEB-Sac se prepararon adicionando al MEB comercial 2% de glucosa o sacarosa, respectivamente. Todos los medios se autoclavaron a 121 °C durante 20 min. En estos estudios, *P. expansum* CMP-1 se incubó en 50 mL de medio (5×10^5 conidios/mL) en matraces de 250mL a 25 °C en agitación constante (150 rpm).

Para la producción y purificación de la PeAfpA según el protocolo estándar (Garrigues et al., 2018) se ha utilizado medio *Penicillium chrysogenum Minimal-Medium* (PcMM) autoclavado, cuya composición es 35,3 mM NaNO₃, 2 mM MgSO₄, 6,7mM KCl, 18 mM FeSO₄, 58mM sacarosa, 2,5% tampón de fosfato potásico y 0,1% solución de elementos traza (0.1% FeSO₄ x 7 H₂O, 0.9% ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.4% CuSO₄ x 5 H₂O, 0.01% MnSO₄ x H₂O, 0.01% H₃BO₃, 0.01% Na₂MoO₄ x 2 H₂O). *P. expansum* ha sido incubado en 200 mL de medio PcMM en una concentración de 5×10^5 conidios /mL en un matraz de 1 L a 25 °C en agitación constante (180 rpm).

Purificación de la proteína PeAfpA

La proteína PeAfpA fue purificada siguiendo el protocolo descrito en (Garrigues et al., 2018) a partir del sobrenadante del medio PcMM inoculado con *P. expansum* tras siete días de

incubación a 25 °C. El sobrenadante centrifugado y filtrado sin células fue dializado a 4 °C en agitación utilizando una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3,5kDa (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 22 mm) frente a tampón fosfato 20 mM pH 6,6.

La solución dializada fue sometida a una cromatografía de intercambio catiónico para purificar PeAfpA. Para ello se utilizó el sistema de purificación ÄKTA y la columna de intercambio catiónico 6 mL *RESOURCE_{TM} S* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) equilibrada en el mismo tampón de diálisis. Las proteínas fueron eluidas en 20 fracciones de 6mL aplicando un gradiente lineal de NaCl de 0M a 1M en el mismo tampón.

Las fracciones 7, 8 y 9 de la primera cromatografía, enriquecidas en PeAfpA, fueron sometidas a una segunda diálisis frente a tampón fosfato 20 mM pH 7,6 y cromatografía de intercambio catiónico. Se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo anterior, sustituyendo el tampón fosfato pH 6,6 por el tampón fosfato pH 7,6.

Las fracciones en las dos cromatografías que contienen proteína fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 16% de poliacrilamida cargando 10 µL de muestra concentrada 10x y el marcador de peso molecular *prestained protein size-standard SeeBlue R* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). El gel de SDS PAGE se visualizó mediante tinción con Coomassie Blue.

Las fracciones con proteína pura fueron dializadas frente a agua MILLI-Q y liofilizadas para su mejor preservación.

Producción de AFPs en tejido de manzana infectado por *P. expansum*

Para los ensayos de producción de AFPs en manzana se han utilizado manzanas de la variedad Golden a las que se les practicaron heridas con un punzón de aproximadamente 3 mm de profundidad. En cada fruto se realizaron un total de 12 heridas, 4 a lo largo del ecuador del fruto, 4 en la parte superior y otras 4 en la parte inferior. Las heridas fueron inoculadas con 5 µL de los respectivos inóculos: la muestra de herida con agua y las

muestras de infección con 5×10^6 conidios/mL de *P. expansum* CMP-1. Se añadió al ensayo un control adicional de frutos no heridos. Tras la inoculación, los frutos se mantuvieron en cámaras a 20°C y 90 % de humedad relativa, siendo monitorizados cada día. Tras 1, 2, 3 y 9 días post-infección se recogieron discos de tejido de aproximadamente 5 mm de diámetro con un perforador. Los discos de tejido se congelaron con nitrógeno líquido, se pulverizaron y se guardaron a -80°C para la posterior extracción de proteínas.

Para la extracción de las proteínas de las muestras de tejido de manzana se utilizaron 200 mg de muestra que fue filtrada, secada y colocada en un mortero pre-enfriado con nitrógeno líquido. Se añadió en un ratio 1:2 (400 μ L) tampón de extracción de proteínas descrito previamente (Gandía et al., 2018): 187,5 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 % glicerol, 2 % dodecilsulfato sódico (SDS), 10 mM ditioneitol (DTT), 1mM ortovanadato de sodio, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1X inhibidor de fosfatasas (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA), 10 mM β -mercaptoetanol, 5 μ L inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). La muestra se homogenizó, se mezcló y se incubó 5 minutos a 95°C para provocar la ruptura celular. Finalmente, la solución fue centrifugada para descartar los restos celulares.

Western blot

Se llevó a cabo un análisis Western blot para identificar la presencia de PeAfpA, PeAfpB y/o PeAfpC en el sobrenadante de los medios de cultivo YPD Glc/Sac y MEB Glc/Sac inoculados con *P. expansum* tras 2, 3, 6 y 8 días de crecimiento. También se realizó un análisis Western blot para identificar la presencia de PeAfps en la solución proteica extraída del tejido de manzana control, herido e infectado tras 1, 2, 3 y 9 días desde el momento de inoculación.

Las proteínas de las soluciones proteicas se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE al 16%. En el ensayo de producción en medio líquido se cargaron 10 μ L de sobrenadante en la SDS-PAGE y en el ensayo de producción de proteínas en tejido de manzana, se cargaron 15 μ L de solución proteica. Las proteínas separadas fueron transferidas a la membrana de transferencia de nitrocelulosa *Amersham Protran 0.20 μ m NC* (GE Healthcare). La detección de AFPs se llevó a cabo utilizando los anticuerpos anti-

AfpA, anti-AfpB y anti-AfpC (diluidos 1:2500, 1:1500 y 1:5000 respectivamente). Se utilizó el anticuerpo secundario *ECL NA934 horseradish peroxidase donkey anti-rabbit* (GE Healthcare) y para la detección por quimioluminiscencia se utilizó el agente *ECL™ Select Western blotting detection reagent* (GE Healthcare) y se visualizó mediante el instrumento LAS-1000 (Fujifilm).

Ensayo de actividad antifúngica *in vivo*: infección en manzanas

Los ensayos para estudiar la capacidad antifúngica frente a *P. expansum* de las proteínas PeAfpA y PdAfpB se llevaron a cabo sobre manzanas de la variedad Golden. Se realizaron 7 tratamientos: control (inóculo de *P. expansum*), tres tratamientos con PeAfpA (inóculo de *P. expansum* y PeAfpA en una concentración de 1, 10 y 100 µg/mL) y tres tratamientos con PdAfpB (inóculo de *P. expansum* y PdAfpB en una concentración de 1, 10 y 100 µg/mL) con un total de 15 manzanas/tratamiento. Cada manzana se hirió un total de 4 veces distribuidas en el ecuador de la manzana de manera equidistante utilizando un punzón de aproximadamente 3 mm de profundidad. Las heridas fueron inoculadas con 5 µL de los respectivos inóculos: la muestra control con una solución de 10⁴ conidios/mL de *P. expansum* CMP-1 y las muestras de tratamiento con una solución de 10⁴ conidios/mL de *P. expansum* CMP-1 y 1/10/100 µg/mL de PeAfpA o PdAfpB. Las manzanas fueron conservadas a 20 °C y un 90% de humedad relativa y los síntomas de infección de cada herida fueron controlados diariamente durante los siete días consecutivos tras la inoculación.

Ensayo de actividad antifúngica *in vitro*

Los ensayos para estudiar la actividad antifúngica de las proteínas AFPs de manera sinérgica se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano con un volumen de 100 µL. En cada pocillo se añadieron 50 µL de conidios de *P. expansum* (5 x 10⁴ conidios/mL) en medio *Potato Dextrose Broth* (PDB) diluido 1/10 que contiene cloranfenicol 0,02% (w/v). El hongo se trató con 25 µL de cada una de las proteínas correspondientes (PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC y PdAfpB) concentrada 4x a partir de las diluciones seriadas para así obtener la concentración final deseada, calculada en función de los valores MIC de las proteínas, y se

alcanzó el volumen final de 100 μ L con agua destilada en los controles con solo una proteína. Las Tablas 2, 3 y 4 recogen el esquema de distribución de las muestras en las placas de 96 pocillos.

Tabla 2. Tabla esquema de las condiciones experimentales de la microplaca para el ensayo de sinergia entre las proteínas PdAfpB y PeAfpA.

			PeAfpA 0,25 μ g/mL	PeAfpA 0,5 μ g/mL	PeAfpA 1 μ g/mL							
<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	Pd AfpB μ g/ mL
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	

Tabla 3. Tabla esquema de las condiciones experimentales de la microplaca para el ensayo de sinergia entre las proteínas PeAfpB y PeAfpA.

			PeAfpA 0,25 μ g/mL	PeAfpA 0,5 μ g/mL	PeAfpA 1 μ g/mL							
<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	Pe AfpB μ g/ mL
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	

Tabla 4. Tabla esquema de las condiciones experimentales de la microplaca para el ensayo de sinergia entre las proteínas PeAfpA y PeAfpC.

			PeAfpC 0,5µg/mL	PeAfpC 4µg/mL	PeAfpC 32µg/mL							
<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	<i>P.exp</i>	Pe AfpA µg/ mL
0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	

Las placas se incubaron estáticamente durante 72 horas a 25 °C. El crecimiento de *P. expansum* se determinó midiendo la densidad óptica a 600nm (OD₆₀₀) utilizando un espectrofotómetro de placas *Fluostar Omega* (BMG labtech). A partir de dichas medidas se calcularon la media y la desviación estándar de la OD₆₀₀ para generar las curvas dosis-respuesta y realizar un análisis de varianza (ANOVA) de varios factores con el programa *Statgraphics XVII-X64*.

RESULTADOS

Producción de las AFPs de *P. expansum*

a) Producción de las AFPs en medios de cultivo líquido

Se han realizado ensayos de crecimiento de *P. expansum* CMP-1 en medios MEB e YPD a 25 °C para la producción de las proteínas PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC. Para estudiar el efecto de la fuente de carbono, se han utilizado los medios MEB e YPD usando glucosa y sacarosa de manera independiente (ver la explicación detallada de los medios en la sección de Materiales y Métodos) (Garrigues et al., 2018). Se ha controlado visualmente el crecimiento (Figura 5) y se han recogido muestras de los sobrenadantes de los cultivos tras 2, 3, 6 y 8 días tras la inoculación de *P. expansum*.

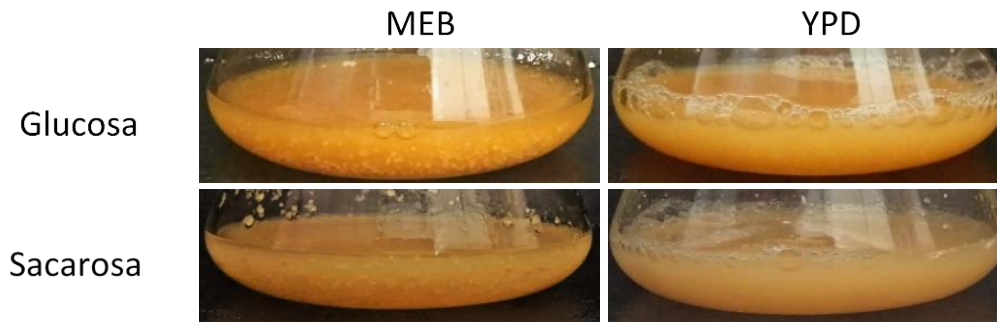


Figura 5. Crecimiento de *P. expansum* en los distintos medios de cultivo. *P. expansum* (5×10^5 conidios/mL) crecido en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo (MEB o YPD en glucosa o sacarosa, según se indica) durante 8 días a 25°C.

Las muestras de sobrenadante, previamente separadas del micelio y concentradas, fueron analizadas mediante SDS-PAGE. En los sobrenadantes a 6 y 8 días de las cuatro condiciones de cultivo estudiadas (MEB Glc/Sac e YPD Glc/Sac) se observaron bandas de un tamaño similar al predicho *in silico* para las proteínas AFP: 6,64, 6,57 y 8,12 kDa para PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC respectivamente, también incluidas en el gel para un mejor efecto comparativo (Garrigues et al., 2018) (Figura 6).

Para confirmar la presencia de las proteínas PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC, se realizó un ensayo de Western blot con las muestras a 8 días de las cuatro condiciones de cultivo estudiadas usando los anticuerpos específicos Anti-PeAfpA, Anti-PeAfpB y Anti-PeAfpC, previamente obtenidos y caracterizados por el grupo (Garrigues et al., 2018). Se observó reacción con los anticuerpos de PeAfpA y PeAfpC en los sobrenadantes de los cultivos en YPD (con Glc o Sac), pero no en los cultivos MEB. No fueron inmunodetectadas señales específicas de PeAfpB en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 7).

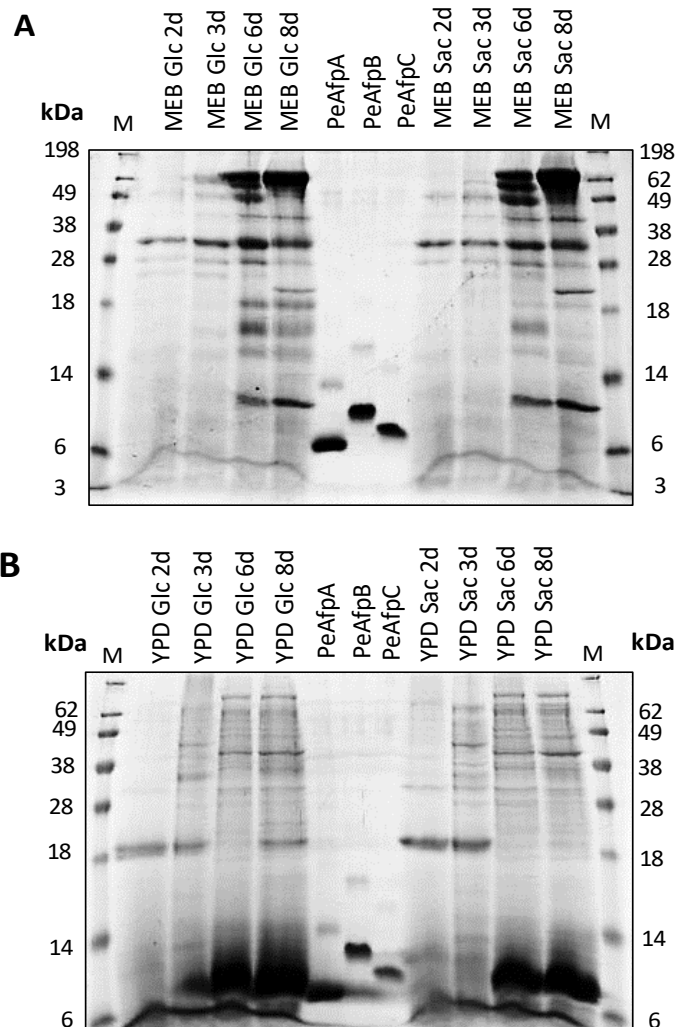


Figura 6. Análisis mediante SDS-PAGE de la producción de AFPs de *P. expansum* en distintos medios de cultivo. SDS-PAGE de 10 μ L de los sobrenadantes 10X de medio MEB Glc y MEB Sac (A) y medio YPD Glc e YPD Sac (B) a los 2, 3, 6 y 8 días de crecimiento. La primera y última carrera (M) corresponden a los marcadores de peso molecular SeeBlue; las carreras centrales (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC) corresponden a 2 μ g de las tres proteínas puras. Los gels de SDS-PAGE se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue.

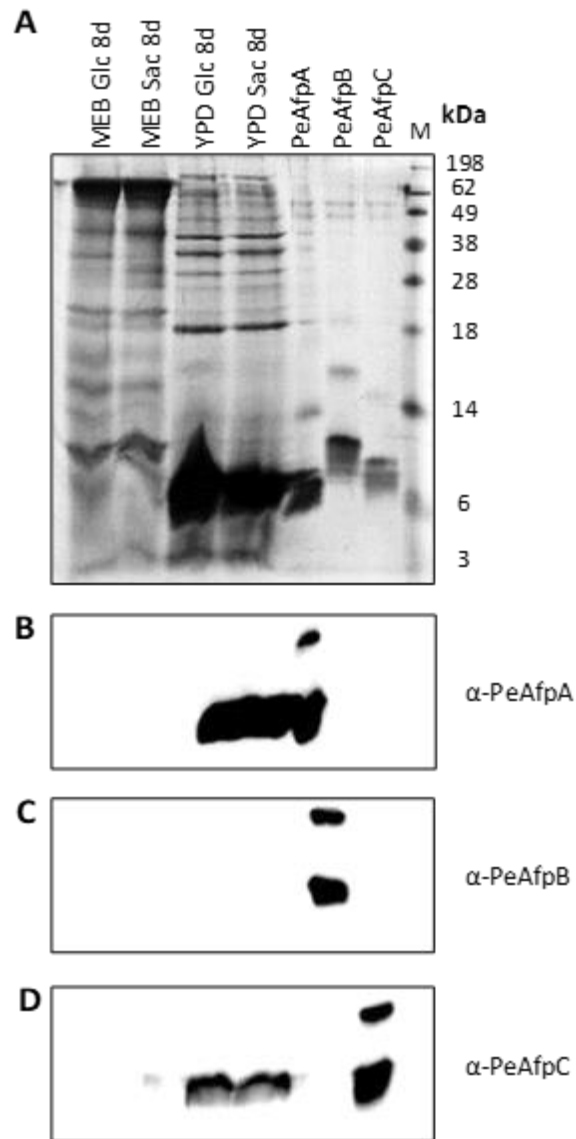


Figura 7. Análisis de la producción de AFPs por *P. expansum* mediante Western blot de los sobrenadantes de cultivo en medios MEB e YPD. (A) SDS-PAGE y análisis Western con los anticuerpos anti-PeAfpA (B), anti-PeAfpB (C) y anti-PeAfpC (D). Las cuatro primeras carreras corresponden a 10 μ L de los sobrenadantes 10X; las tres carreras siguientes a 2 μ g de cada una de las PeAFPs puras y la última carrera al marcador de pesos moleculares SeeBlue. Los gels de SDS-PAGE se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue.

La proteína PeAfpC no se había detectado hasta el momento en los sobrenadantes de cultivo de *P. expansum* crecido el medio PcMM o PDB (Garrigues et al., 2018), por lo que,

para estudiar más en profundidad su producción, se realizó un ensayo Western blot con las muestras de sobrenadante de cultivo YPD-Glc e YPD-Sac a 2, 3, 6 y 8 días. Se confirmó por inmunodetección la presencia de PeAfpC en los sobrenadantes de las muestras cultivadas en las dos condiciones tras 6 y 8 días de incubación y su ausencia en las muestras tras 2 y 3 días de incubación (Figura 8).

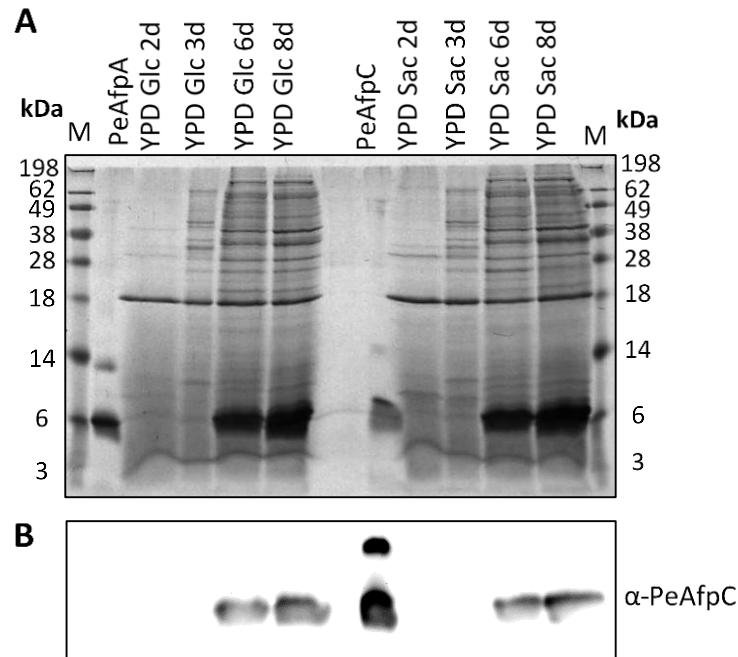


Figura 8. Análisis mediante Western blot de los sobrenadantes de cultivo de *P. expansum* en medio YPD a los 2, 3, 6 y 8 días de crecimiento. (A) SDS-PAGE y (B) análisis Western con el anticuerpo anti-PeAfpC. La primera y última carrera (M) corresponden a los marcadores de peso molecular SeeBlue. Se han cargado en el gel 10 μ l de los sobrenadantes de cultivo 10x y 2 μ g de PeAfpA y PeAfpC. Los geles de SDS-PAGE se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue.

b) Producción de las AFPs en manzana

Se realizó un ensayo para estudiar la producción de AFPs en el huésped natural de *P. expansum*, la manzana. Para ello, se infectaron manzanas con *P. expansum* y se recogieron muestras tras 1, 2, 3 y 9 días de infección, obteniendo un 100% de incidencia de infección en el día 9 (Figura 9). También se tomó una muestra control de tejido sano y una muestra

de control de tejido herido, para la cual el fruto había sido previamente herido e inoculado con agua en ausencia de esporas del hongo.

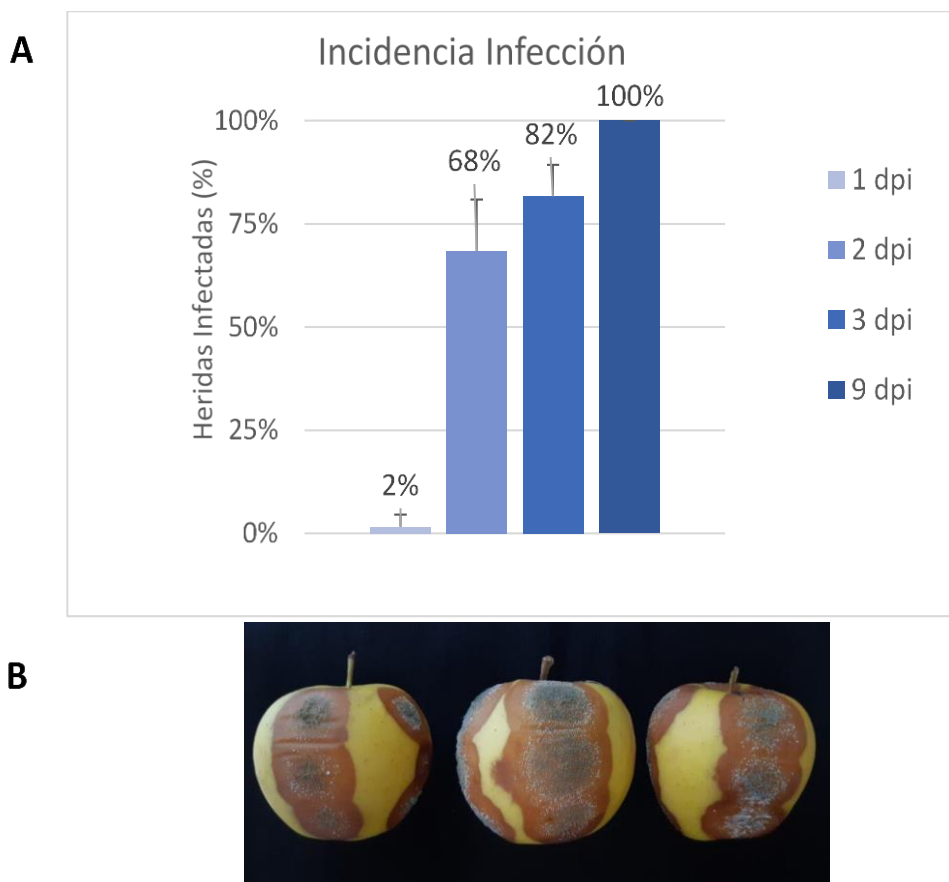


Figura 9. Infección causada por *P. expansum* en frutos de manzana. (A) Gráfica de la incidencia de infección en las heridas de las manzanas infectadas con 5×10^6 conidios/mL de *P. expansum* CMP-1 a 1, 2, 3 y 9 días post-infección. (B) Fotografía ejemplo de tres manzanas infectadas en el día 9 post-infección.

La solución proteica fue extraída a partir de 200 mg de la muestra de tejido, se incubó a 95°C para la desnaturalización de las proteínas y se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot. No se encontró ninguna proteína en las muestras estudiadas que reaccionara con los anticuerpos Anti-PeAfpA, Anti-PeAfpB y Anti-PeAfpC (Figura 10), lo que indica que ninguna de las tres proteínas es producida durante el proceso de infección.

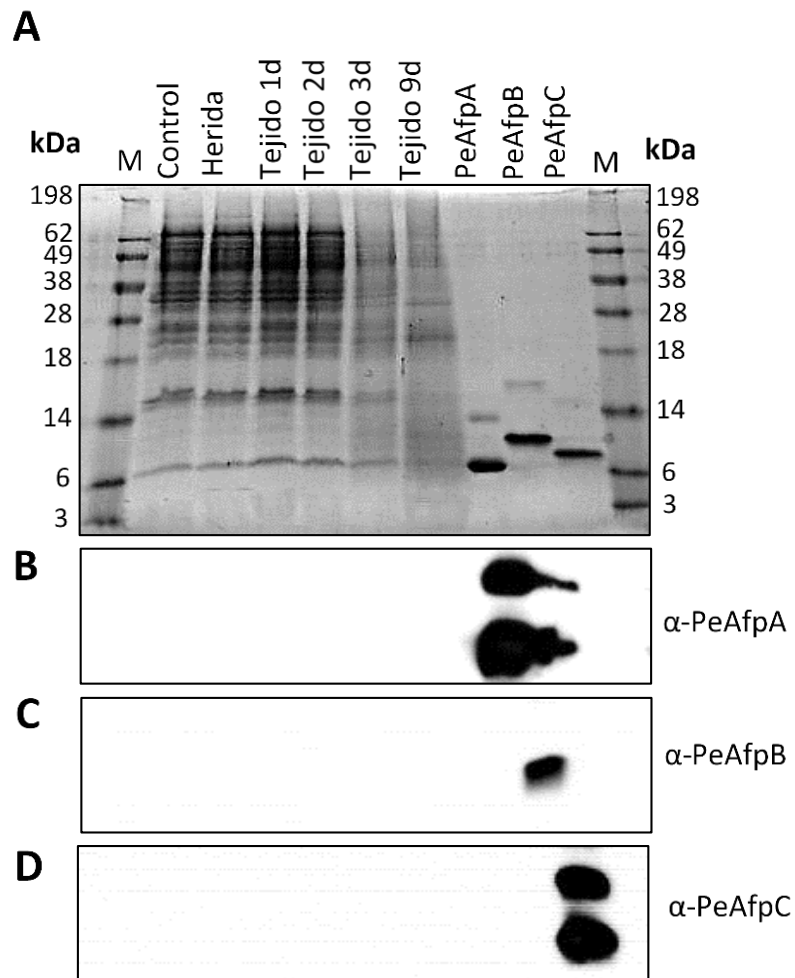


Figura 10. Análisis mediante Western blot de tejidos de manzana infectados con *P. expansum*. (A) SDS-PAGE de tejidos a 1, 2, 3 y 9 días post-infección; la primera y última carrera corresponden al marcador de peso molecular SeeBlue; las carreras 2 y 3 corresponden a tejido de manzana sin infectar (control) y a tejido de manzana herido pero no infectado (herida); las carreras 8-10 corresponden a las AFPs de *P. expansum* (2 μ g). El gel de SDS-PAGE se visualizó mediante tinción con Coomassie Blue. (B, C, D) Análisis Western con los anticuerpos anti-PeAfpA (B), anti-PeAfpB (C) y anti-PeAfpC (D).

Purificación de PeAfpA

Para poder realizar ensayos *in vivo* e *in vitro*, se purificó la proteína PeAfpA, que ha demostrado tener la mayor actividad antifúngica de las tres AFPs de *P. expansum* en ensayos *in vitro* de actividad antimicrobiana (Garrigues et al., 2018). Se purificó a partir del sobrenadante de *P. expansum* crecido en medio mínimo PcMM tras siete días de incubación

(Figura 11A), condiciones que ya han dado resultados satisfactorios para la producción de PeAfpA, según el protocolo previamente publicado (Garrigues et al., 2018). Se purificó la proteína mediante una filtración inicial para separar el sobrenadante del micelio, una diálisis en agua y tampón fosfato 20 mM pH 6,6 para eliminar las sales y moléculas pequeñas de la solución proteica y conferir a la solución el pH adecuado, y un paso final de cromatografía de intercambio catiónico para separarla del resto de proteínas. En la diálisis se ha utilizado un tampón fosfato pH 6,6 aprovechando el elevado punto isoeléctrico de la PeAfpA (9,5) para cargar la PeAfpA positivamente. La proteína se eluye con un gradiente de sal (NaCl) y se observa como un único pico en la cromatografía en las fracciones 7, 8, 9, 10 y 11 (Figura 11B-C).

Para comprobar la eficiencia del proceso de purificación se ha llevado a cabo una electroforesis SDS-PAGE con la muestra inicial, la muestra post-diálisis, la muestra del *Flow through* (solución con las proteínas que no quedan retenidas en la columna) y las muestras de las cinco fracciones donde se ha acumulado la proteína PeAfpA (F7-11). En los carriles correspondientes a las bandas 10 y 11 se observa únicamente la banda correspondiente a la PeAfpA y las bandas correspondientes a la PeAfpA en forma de dímero y trímero debido a la alta concentración en la fracción, por lo que la purificación se ha llevado a cabo de manera satisfactoria. No obstante, en las fracciones 7, 8 y 9 se observa, además de la banda correspondiente a la PeAfpA, una banda inespecífica de un tamaño ligeramente superior (Figura 11C).

Las fracciones 7, 8 y 9 procedentes de la primera cromatografía fueron sometidas a una diálisis utilizando el tampón a pH 7,7 y a una segunda cromatografía para separar la proteína inespecífica y obtener la PeAfpA pura. Se observaron dos picos sobrepuestos de proteína eluida que abarcan las fracciones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (Figura 12A). Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en la que se continuó observando la banda inespecífica en las fracciones 3, 4 y 5, por lo que fueron descartadas; mientras que en las fracciones 6, 7, 8 y 9 solo se observaron las bandas correspondientes a la PeAfpA pura (Figura 12B). El rendimiento total obtenido de PeAfpA pura tras las dos cromatografías se calculó por absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{280} = 0,64$) (1) y fue de 46 mg/L.

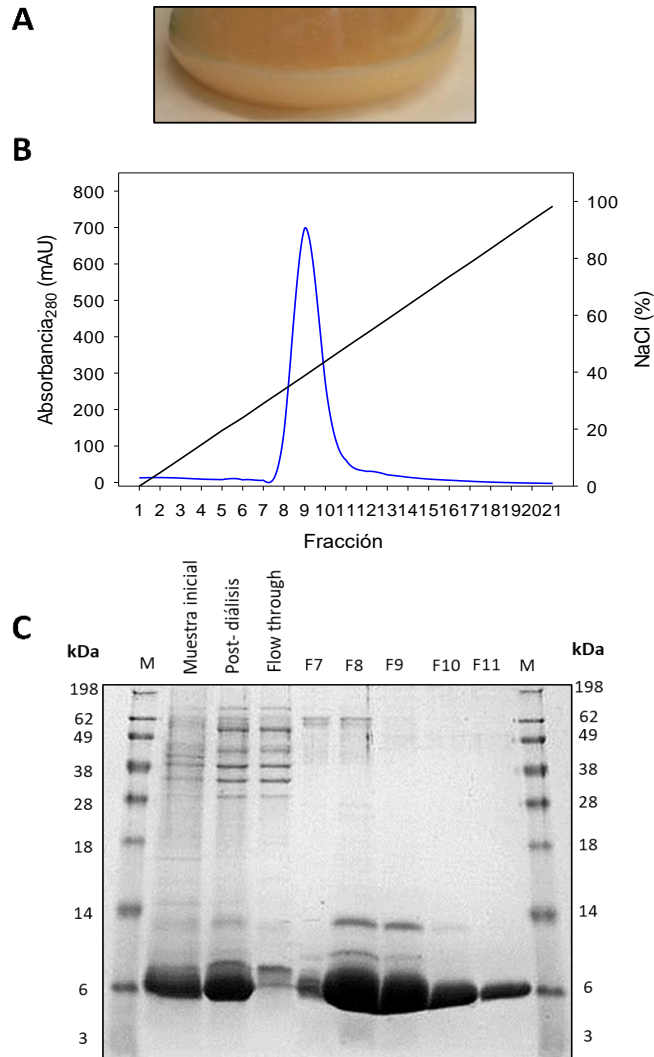


Figura 11. Purificación de PeAfpA. (A) Crecimiento de *P. expansum* en PcMM. (B) Cromatografía de intercambio catiónico del sobrenadante de cultivo; se muestra en azul A_{280} de las fracciones eluidas de la columna y en negro el gradiente de NaCl. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie de las fracciones 7-11; M: marcador de peso molecular SeeBlue, Muestra inicial: sobrenadante de cultivo de *P. expansum*, Post-dialísis: sobrenadante de cultivo dializado, Flowthrough: Fracción de proteína no retenida en la columna.

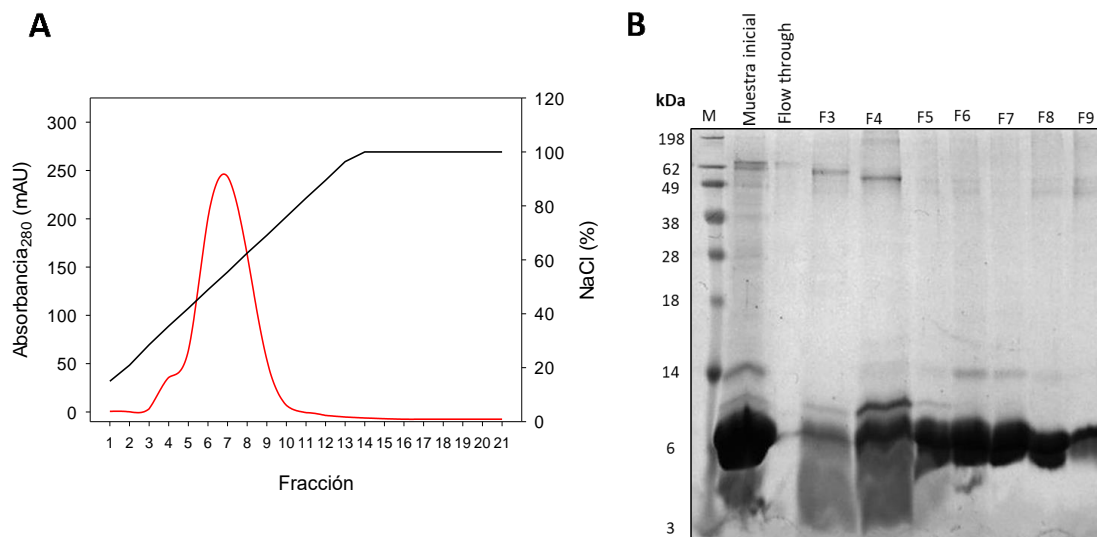


Figura 12. Purificación de PeAfpA. (A) Cromatografía de intercambio catiónico de las fracciones 7-9 de la primera cromatografía; se muestra en rojo A_{280} de las fracciones eluidas de la columna y en negro el gradiente de NaCl. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie de las fracciones 3-9; M: marcador de peso molecular SeeBlue, Muestra inicial: Fracciones 7-9, Flowthrough: Fracción de proteína no retenida en la columna.

Ensayos de infección sobre manzanas

La PeAfpA ha demostrado ser altamente efectiva frente a varios hongos patógenos, incluido el mismo hongo productor de dicha proteína, *P. expansum*, en ensayos *in vitro* de actividad antimicrobiana. También se ha observado en ensayos *in vivo* que PeAfpA protege frente a la infección causada por el hongo *P. digitatum* en naranjas y frente a la causada por *B. cinerea* en hojas y frutos de tomate (Garrigues et al., 2018).

Basándose en estos resultados se diseñó un experimento para estudiar la capacidad de protección de la PeAfpA frente a la infección de *P. expansum* en manzana. También se estudió la capacidad antifúngica contra *P. expansum* de la proteína de clase B PdAfpB procedente de *P. digitatum*, que ha sido previamente descrita como activa en ensayos *in vitro* frente a este hongo (Garrigues et al., 2017). Para ello, las manzanas fueron heridas e inoculadas con 10^4 conidios/mL de *P. expansum* y con 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de PeAfpA o

PdAfpB. Se puede observar como el tratamiento con PeAfpA resulta en una pequeña disminución de la media de las heridas infectadas a lo largo de los días post-inoculación, respecto al control (inóculo de *P. expansum* en ausencia de proteína) y respecto a los tratamientos con PdAfpB. No obstante, dicha reducción no alcanza significación estadística debido a que hay mucha variabilidad en los resultados, por lo que sería necesario repetir el experimento para confirmar o descartar el efecto protector de PeAfpA sobre *P. expansum* (Figura 13).

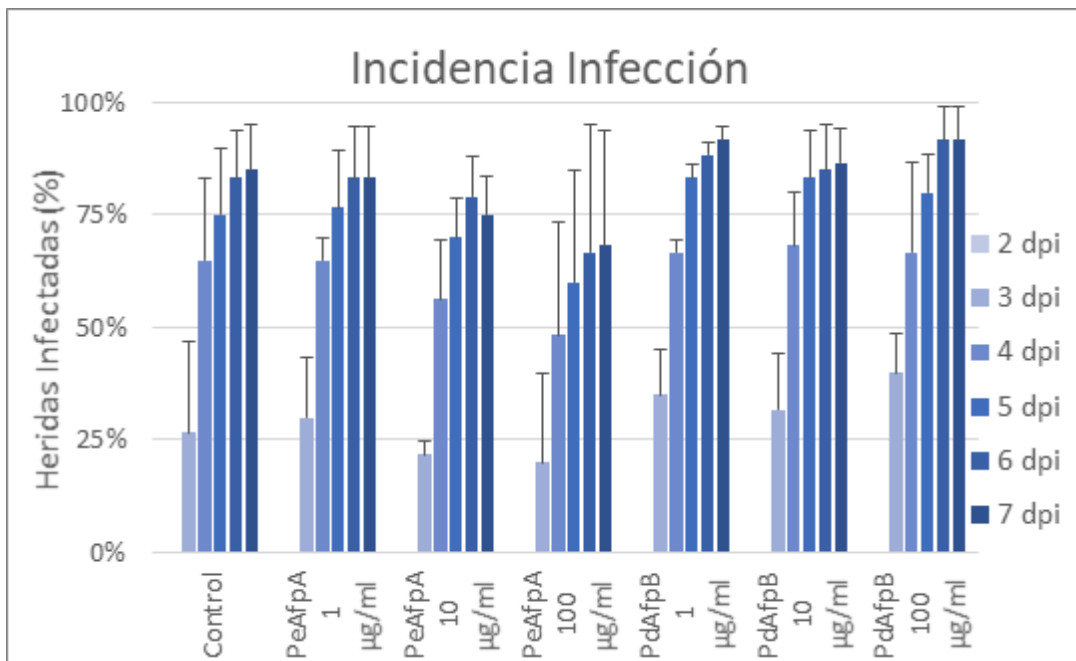


Figura 13. Efecto de las AFPs sobre la infección causada por *P. expansum* en frutos de manzana. Los frutos de manzana fueron inoculados con *P. expansum* (10^4 conidios/mL) sólo (muestra control), o en combinación con PeAfpA y PdAfpB a 1, 10 y 100 µg/mL. Se muestran los resultados como la media del porcentaje de heridas infectadas \pm SD para cada tratamiento y día post inoculación (dpi).

Ensayos de sinergia de AFPs *in vitro*

La actividad antimicrobiana de las proteínas PeAfpB y PeAfpC también había sido estudiada previamente frente a varios hongos patógenos en ensayos *in vitro*. PeAfpB presentó efecto antifúngico frente al propio hongo productor, *P. expansum*, y frente a otros hongos filamentosos, en un perfil de actividad similar a PeAfpA y a PdAfpB, aunque con menor

potencia. Sin embargo, la proteína PeAfpC no mostró ningún efecto frente a los microorganismos testados (Garrigues et al., 2017). Para estudiar la función de las proteínas de *P. expansum* y buscar estrategias para obtener un mayor efecto antifúngico contra *P. expansum*, se llevaron a cabo ensayos de sinergia de PeAfpB y PeAfpC junto con la proteína PeAfpA y también de esta con la proteína PdAfpB, puesto que son las que han presentado más actividad hasta el momento.

Los experimentos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos y se diseñaron basándose en los MIC previamente descritos para las proteínas utilizadas frente a *P. expansum* (Tabla 1).

a) Ensayo de sinergia entre la proteína PeAfpA y las proteínas PdAfpB y PeAfpB sobre *P. expansum*.

El experimento fue diseñado con tres concentraciones fijas de PeAfpA (0,25, 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por triplicado a las que se les ha añadido PdAfpB o PeAfpB en una concentración creciente que se va duplicando desde 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. También se ha incluido un control de *P. expansum* sin ninguna proteína, *P. expansum* tratado con la proteína PeAfpA y *P. expansum* tratado con la proteína PdAfpB o PeAfpB (detalle del diseño experimento en Tabla 2 y Tabla 3, Material y Métodos).

A partir de las medidas de OD tras 24, 48 y 72 horas de incubación se llevó a cabo un ANOVA de varios factores para determinar la posible existencia de interacciones positivas o negativas entre las proteínas (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Análisis ANOVA de las interacciones entre las proteínas PdAfpB y PeAfpA sobre el crecimiento de *P.expansum*. En color rojo se indican las proteínas (elementos principales: A y B) y la interacción entre ellas (AB). El valor-P inferior a 0,05 indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre OD con un 95,0% de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A: PdAfpB	1,22436	7	0,174908	126,57	<0,0001
B: PeAfpA	0,26342	3	0,087805	63,54	<0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,24831	21	0,0118243	8,56	<0,0001
RESIDUOS	0,08845	64	0,0013820		
TOTAL (CORREGIDO)	1,82453	95			

Tabla 6. Análisis ANOVA de las interacciones entre las proteínas PeAfpB y PeAfpA sobre el crecimiento de *P.expansum*. En color rojo se indican las proteínas (elementos principales: A y B) y la interacción entre ellas (AB). El valor-P inferior a 0,05 indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre OD con un 95,0% de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A: PeAfpB	1,02167	7	0,145953	327,23	<0,0001
B: PeAfpA	0,43916	3	0,146388	328,20	<0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,27996	21	0,0133314	29,89	<0,0001
RESIDUOS	0,02855	64	0,0004460		
TOTAL (CORREGIDO)	1,76934	95			

El análisis ANOVA demostró, como ya se sabía, que en ambos ensayos los factores (PeAfpA y PdAfpB o PeAfpB) por separado tienen un efecto negativo estadísticamente significativo sobre el crecimiento de *P. expansum* (OD₆₀₀). Asimismo, se demostró una interacción positiva en ambas combinaciones con un 95,0% de nivel de confianza (valor P < 0,05). Por lo tanto, hay un efecto antifúngico sinérgico frente a *P. expansum* entre las proteínas

PeAfpA y las dos AFPs de clase B testadas, PdAfpB y PeAfpB. También se generaron las curvas dosis-respuesta para visualizar dicho efecto (Figura 14 y Figura 15).

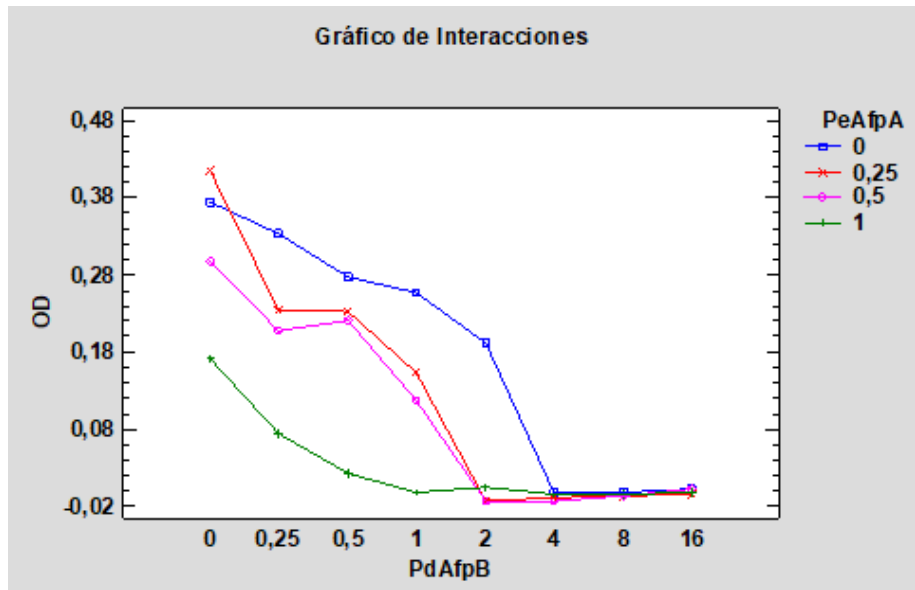


Figura 14. Gráfica de interacción dosis-respuesta del efecto de PdAfpB y PeAfpA a distintas concentraciones sobre *P. expansum* tras 48 horas de incubación a 25°C. Se indican los valores OD₆₀₀ (eje vertical) del cultivo de *P. expansum* tratado con PeAfpA a cuatro concentraciones fijas (0, 0,25, 0,5 y 1 µg/mL) y tratado con PdAfpB a una concentración creciente de 0 a 16 µg/mL (eje horizontal).

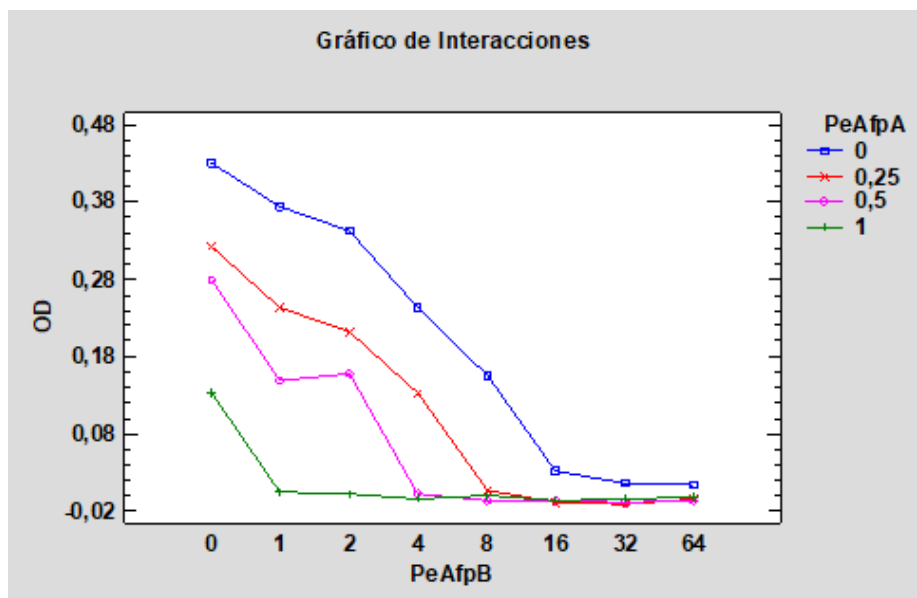


Figura 15. Gráfica de interacción dosis-respuesta del efecto de PeAfpB y PeAfpA a distintas concentraciones sobre *P. expansum* tras 48 horas de incubación a 25°C. Se indican los valores OD₆₀₀ (eje vertical) del cultivo de *P. expansum* tratado con PeAfpA a cuatro concentraciones fijas (0, 0,25, 0,5 y 1 µg/mL) y tratado con PeAfpB a una concentración creciente de 0 a 64 µg/mL (eje horizontal).

b) Ensayo de sinergia entre las proteínas PeAfpA y PeAfpC sobre *P. expansum*.

En el ensayo de sinergia entre las proteínas PeAfpA y PeAfpC, el experimento se ha diseñado de manera diferente, ya que la proteína PeAfpC no ha demostrado tener efecto antifúngico frente a *P. expansum* en estudios previos *in vitro* (Garrigues et al., 2018). Se han utilizado tres concentraciones fijas de PeAfpC (0,5, 4 y 32 µg/mL) por triplicado a las que se les ha añadido PeAfpA en una concentración creciente que se va duplicando desde 0,125 µg/mL a 8 µg/mL. También se ha incluido un control de *P. expansum* sin ninguna proteína, *P. expansum* mezclado con la proteína PeAfpC y *P. expansum* mezclado con la proteína PeAfpA (detalle del diseño del experimento en Tabla 4, Materiales y Métodos).

Se llevó a cabo el análisis de ANOVA y se generó la curva dosis-respuesta de la misma manera que en los ensayos previamente descritos (Tabla 7 y Figura 16).

Tabla 7. Análisis ANOVA de las interacciones entre las proteínas PeAfpC y PeAfpA sobre el crecimiento de *P. expansum*. En color rojo se indican las proteínas (elementos principales: A y B) y la interacción entre ellas (AB). El valor-P inferior a 0,05 indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre OD con un 95,0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: PeAfpA	3,45259	7	0,493227	343,38	<0,0001
B: PeAfpC	0,01887	3	0,006289	4,38	0,0072
INTERACCIONES					
AB	0,04731	21	0,00225268	1,57	0,0866
RESIDUOS	0,09193	64	0,00143638		
TOTAL (CORREGIDO)	3,61069	95			

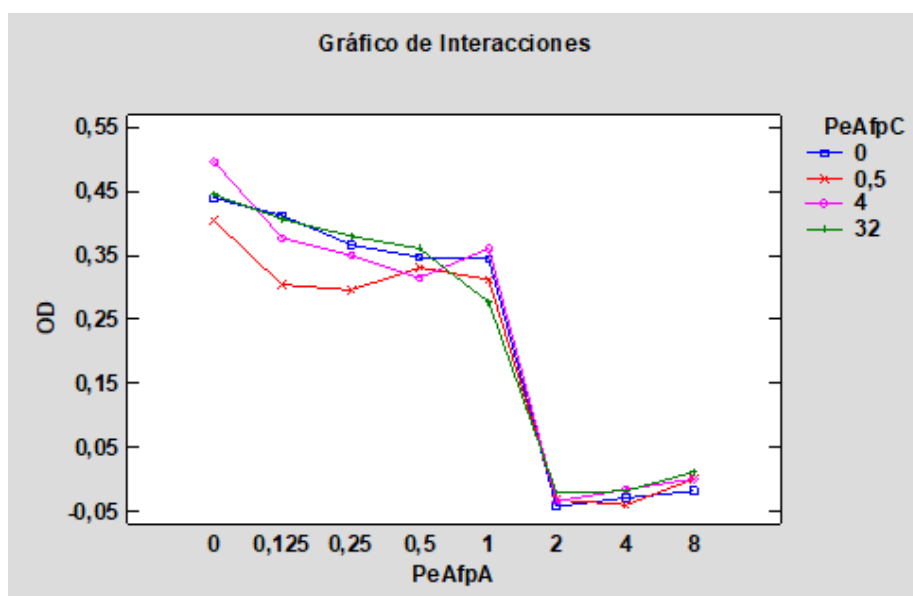


Figura 16. Gráfica de interacción dosis-respuesta del efecto de PeAfpA y PeAfpC a distintas concentraciones sobre *P. expansum* tras 72 horas de incubación a 25°C. Se indican los valores OD₆₀₀ (eje vertical) del cultivo de *P. expansum* tratado con PeAfpC a cuatro concentraciones fijas (0, 0,5, 4 y 32 µg/mL) y tratado con PeAfpA a una concentración creciente de 0 a 8 µg/mL (eje horizontal).

En este caso, ambos factores (PeAfpA y PeAfpC) tienen efecto estadísticamente significativo por separado (valor P < 0,05), pero no en interacción, por lo que no existe un efecto

sinérgico entre ambas proteínas (Figura 16). Este ejemplo de no interacción sirve además como una confirmación adicional de la interacción mostrada en los casos anteriores.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era profundizar en el estudio de las AFPs de *P. expansum* (PeAfpA, PeAfpB y PeAfpC) desde un punto de vista de producción y de capacidad antifúngica.

Como ya se ha comentado, existen algunas AFPs que, por el momento, no se han logrado obtener a partir de los sobrenadantes de cultivos de su hongo productor, como las dos representantes de clase B, PdAfpB de *P. digitatum* y la PAFB de *P. chrysogenum*. Una posible explicación de este hecho era que ambas proteínas tenían una actividad antifúngica muy potente que afectaba incluso a los propios hongos productores, por lo que la producción debía estar fuertemente regulada y autolimitada. Sin embargo, esta hipótesis no se puede aplicar en el caso de las AFPs de *P. expansum*, ya que la proteína PeAfpA con un elevado efecto antifúngico frente a su hongo productor se pudo obtener a partir del sobrenadante de cultivo del hongo en PcMM, mientras que las proteínas PeAfpB y PeAfpC que no se observaron en dicho sobrenadante, tienen un efecto antifúngico frente a *P. expansum* menos pronunciado en el caso de la PeAfpB y nulo en el caso de la PeAfpC.

En este trabajo se ha conseguido producir la proteína PeAfpA y, por primera vez, la proteína PeAfpC a partir del sobrenadante de cultivo de *P. expansum* en medio YPD independientemente de la fuente de carbono utilizada. No obstante, la proteína PeAfpB sigue sin ser detectada en el sobrenadante de ninguno de los medios testados. Además, estudios de análisis de expresión génica realizados por el grupo investigador han demostrado que en estas mismas condiciones de cultivo el gen *PeAfpB* no se expresa, mientras que sí existe una relación entre la expresión de los genes que codifican PeAfpA y PeAfpC y la producción de dichas proteínas (datos no publicados). Por tanto, el caso de PeAfpB es diferente al de las otras dos representantes de clase B PdAfpB y PAFB, cuyos ARNs mensajeros sí pudieron ser detectados (Garrigues et al., 2016; Huber et al., 2018). Aunque

estos resultados parecerían indicar que las AFPs de clase B no se producen de forma natural, no hay que olvidar que otras proteínas de la misma clase, como la proteína PgAFP de *P. chrysogenum*, es producida en grandes cantidades en el medio MEB evaluado en este trabajo (Delgado et al., 2015).

Otra posible hipótesis es que las AFPs estén relacionadas con el proceso de infección del hongo, y que por tanto podrían producirse durante este proceso. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que ninguna de las tres AFPs está implicada en con la infección de manzana producida por *P. expansum*. Esto ya se apuntaba en el caso de la PdAfpB de *P. digitatum*, en el que la mutación por delección del gen correspondiente no tuvo ningún efecto fenotípico sobre la infección del hongo sobre naranja (Garrigues et al., 2016). Futuros estudios del grupo intentarán eliminar el gen codificante de PeAfpA en *P. expansum* y comprobar su efecto sobre la infección en manzana, aunque el presente trabajo indicaría que no existe ningún efecto.

Teniendo en cuenta estos resultados, por el momento el patrón de expresión de las proteínas AFPs de *P. expansum* sigue sin estar claro y sería conveniente continuar en esta línea de investigación, lo que permitiría entender la función biológica de estas proteínas y la razón de la existencia de AFPs de distintas clases filogenéticas en un mismo hongo productor. Hasta la fecha no se había descrito ningún hongo que produjera de forma natural varias AFPs a pesar de la existencia de los genes codificantes en su genoma.

La aplicación de las AFPs en conservación postcosecha requiere la demostración de su eficacia en ensayos in vivo de infección, donde se intentan simular las condiciones reales de infección hongo-fruto. En este trabajo se han realizado este tipo de ensayos utilizando el patosistema *P. expansum*-manzana y PeAfpA, la proteína más activa en ensayos in vitro frente a *P. expansum* (valor MIC 2 µg/mL). Además, se incluyó la proteína PdAfpB que también había demostrado su eficacia frente al hongo en ensayos *in vitro* (valor MIC 3,2 µg/mL). No se han obtenido resultados satisfactorios con ninguna de las dos proteínas evaluadas. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar cierto efecto protector de PeAfpA, sobre todo a la mayor concentración evaluada, aunque la variabilidad obtenida no

es estadísticamente significativa, por lo que no nos permite asegurar la eficacia de la proteína. Como ya se ha comentado, PeAfpA es capaz de proteger frutos de naranja frente a la podredumbre verde causada por *P. digitatum*, y también de retrasar el crecimiento de *B. cinerea* en frutos de tomate (Garrigues et al., 2018). En ambos casos, la proteína es efectiva frente a fitopatógenos que no son su hongo productor, mientras que en este trabajo PeAfpA ha sido evaluada frente a su hongo productor *P. expansum*. Esta podría ser la causa de la ineficacia de la proteína, tal y como también se ha demostrado en el caso de PdAfpB en infecciones causadas por *P. digitatum* en frutos de naranja (Garrigues et al., 2018). Este trabajo pone de manifiesto la falta de correlación entre los ensayos *in vitro* de actividad antifúngica y los ensayos *in vivo* de protección de frutos, lo que refuerza la necesidad de incluir estos últimos ensayos en los estudios de caracterización de AFPs.

Otra razón que podría explicar la producción de distintas AFPs por un mismo hongo sería la posibilidad de que estas proteínas actuaran de un modo sinérgico. Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos *in vitro* de sinergia entre las AFPs de *P. expansum*, además de incluir a efectos comparativos PdAfpB. Este trabajo ha demostrado que la proteína PeAfpA tiene un efecto antifúngico sinérgico cuando se combina con PeAfpB y con PdAfpB, mientras que dicho efecto no es observado cuando se combina PeAfpA con la proteína PeAfpC. Es interesante el hecho de que las dos proteínas de clase B evaluadas tengan un efecto sinérgico con PeAfpA, por lo que en un futuro se evaluarán más proteínas de esta clase filogenética para saber si es una característica general de estas proteínas. Además, también se llevarán a cabo este tipo de combinaciones en ensayos *in vivo*, ya que sería una estrategia para mejorar el posible efecto protector frente a *P. expansum* en frutos de manzana.

CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido por primera vez detectar la proteína PeAfpC en sobrenadantes de cultivo de *P. expansum*. En concreto, se ha demostrado la producción de PeAfpC en *P. expansum* cultivado en medio YPD, independientemente de la fuente de carbono utilizada.

2. En los medios de cultivo de YPD evaluados en este trabajo, se producen de forma conjunta PeAfpA y PeAfpC. Es la primera vez que se describe la producción de forma natural de dos AFPs de distinta clase filogenética por una misma cepa de hongo en el mismo cultivo.
3. En tejido de manzana infectado por *P. expansum* no se ha hallado ninguna de las tres proteínas PeAfps, apoyando la teoría de que estas proteínas no están relacionadas con el proceso de infección del hongo.
4. PeAfpA no tiene efecto de protección frente a la infección de *P. expansum* sobre frutos de manzana a pesar de ser activa en experimentos de crecimiento *in vitro*. Es necesario repetir este tipo de ensayos en un futuro para reducir la variabilidad encontrada en este trabajo y poder confirmar la eficacia de PeAfpA.
5. Ensayos *in vitro* de combinaciones de AFPs han demostrado el efecto sinérgico frente a *P. expansum* de las combinaciones PeAfpA/PeAfpB y PeAfpA/PdAfpB. Estos resultados abren la posibilidad de aumentar la eficacia de PeAfpA en ensayos *in vivo*.
6. No existe efecto sinérgico entre PeAfpA y PeAfpC en las condiciones evaluadas, por lo que de momento sigue siendo desconocida la posible función de PeAfpC.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer enormemente este trabajo a todos los integrantes del Lab016 del IATA que me han enseñado y me han ayudado muchísimo durante todo este proceso: Mónica, Sandra, Helena, Begoña, Rafael y, por supuesto, a mis tutores del trabajo Paloma y José, que han sabido crear un grupo con un ambiente inmejorable y son todo un ejemplo a seguir tanto a nivel profesional como personal.

También agradecer este trabajo a mi tutora de la universidad, Montse Poblet y a los profesores y compañeros del doble grado que me han acompañado durante estos cinco años.

Por último, agradecer todo el apoyo de mis amigos y familia, especialmente a mis padres que siempre me han apoyado e inspirado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv113. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
2. Campoy, S. and Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochem Pharmacol*, 133, 86-96.
3. Delgado, J., Acosta, R., Rodriguez-Martin, A., et al. (2015). Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology* 205: 23-29.
4. Errampalli, D. (2014). *Penicillium expansum* (Blue Mold). Postharvest decay. Elsevier Academic Press. Eastbourne, UK: 189-231.
5. Gandía, M., Garrigues, S., Hernanz-Koers, M., Manzanares, P. and Marcos, J. F. (2018). Differential roles, crosstalk and response to the Antifungal Protein AfpB in the three Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) pathways of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Genet Biol.* 124:17-28 doi: 10.1016/j.fgb.2018.12.006
6. Garrigues, S., Gandía, M., and Marcos, J.F. (2016). Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(5), 2243-2256. doi: 10.1007/s00253-015-7110-3.
7. Garrigues, S., Gandía, M., Popa, C., Borics, A., Marx, F., Coca, M., et al. (2017). Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein from *Penicillium digitatum*. *Sci. Rep.* 7:14663. doi: 10.1038/s41598-017-15277-w
8. Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., et al. (2018). Three Antifungal Proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. *Front. Microbiol.* 9:2370. doi: 10.3389/fmicb.2018.02370

9. Hegedüs, N., & Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002>
10. Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., et al. (2018). New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. *Scientific Reports* 8(1).
11. Toth, L., Kele, Z., Borics, A., et al. (2016). NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization. *AMB Express* 6(1): 75.

AUTOEVALUACIÓN

Mi estancia de prácticas en el IATA ha sido una experiencia excepcional de aprendizaje tanto a nivel académico como personal. He tenido la oportunidad de trabajar con personas muy profesionales y, a la vez, cercanas y atentas que me han ayudado y aconsejado siempre que lo he necesitado. En cuanto al trabajo general del laboratorio, me ha permitido aplicar y afianzar muchos de los conocimientos teóricos estudiados durante los cuatro años previos de grado a la vez que he adquirido nuevos. Al tratarse de un laboratorio dedicado a la microbiología, he aprendido a ser cuidadosa y a seguir unos protocolos de higiene y esterilidad antes, durante y después de cualquier experimento. Además, pese a tener siempre coordinadores que supervisaban mi proyecto, he podido trabajar de manera independiente, lo que me ha permitido mejorar mi capacidad de resolución de problemas y de desenvolverme y me ha hecho preguntarme y, de este modo, entender mejor, la base de los métodos y técnicas que he utilizado. Esta estancia también me ha permitido aprender a trabajar de una manera colaborativa con el resto de los integrantes del grupo. En cuanto a las tareas llevadas a cabo, he aprendido muchos aspectos básicos de microbiología relacionados con los cultivos celulares: condiciones de incubación, medios de cultivo, preparación y estudio del crecimiento en placas de microtítulo, etc. Además, también he aprendido a analizar, evaluar y discutir los resultados obtenidos de una manera más crítica.

En conclusión, considero que estas prácticas me han ayudado en mi desarrollo personal y académico y me parecen una forma muy buena de completar mis estudios y prepararme para el mundo laboral.